

PROTOCOLO DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO
DE LA PREVALENCIA E INCIDENCIA DEL
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) Y
ANORMALIDADES CITOLÓGICAS DE LA
MUCOSA ANAL DE HOMBRES QUE TIENEN
SEXO CON HOMBRES (HSH) E INFECCIÓN
POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA
HUMANA (VIH).

Departamento de Medicina / Universidad Autónoma de Barcelona

Autora: MARIA DEL MAR RIVERO RODRÍGUEZ

Directores: VICENÇ FALCÓ FERRER (UAB) y CARMEN HIDALGO
TENORIO (Hospital Virgen de las Nieves, Granada)

Trabajo de Investigación, convocatoria de Septiembre 2010.

ÍNDICE:

Índice	Página 2
Resumen	Página 3
Introducción	Página 4
- VPH	Página 4
- VPH y HSH VIH positivos	Página 5
- Cáncer anal	Página 6
- Screening de lesiones intraepiteliales escamosas anales	Página 8
- Vacunación en HSH	Página 9
- Opciones terapéuticas	Página 9
Hipótesis	Página 11
Objetivos	Página 11
Material y métodos	Página 12
Resultados	Página 16
Discusión	Página 17
Conclusiones	Página 17
Bibliografía	Página 18

RESUMEN:

OBJETIVO PRINCIPAL: 1. Validar las pruebas de despistaje precoz de carcinoma de canal anal como son la citología mediante técnica de Papanicolau, y biopsia dirigida por rectoscopia tras tinción de ácido acético al 5%

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1. Estudiar la prevalencia e incidencia del virus papiloma humano (VPH) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el canal anal de hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres (HSH) infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) de nuestra área sanitaria. 2. Establecer un protocolo de seguimiento de ASIL (lesión intraepitelial escamosa anal). 3. Investigar los factores de riesgo asociados a la aparición de ASIL en nuestra cohorte de pacientes HSH e infección VIH. 4. Evaluar la indicación de vacuna del VPH en nuestros pacientes HSH seropositivos. MATERIAL Y METODOS: Se trata de un estudio prospectivo compuesto por HSH e infección VIH procedentes de la consulta de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, y un grupo control de HSH seronegativo equiparable en edad procedentes del entorno de los pacientes. Los pacientes serán seleccionados de forma consecutiva en la consulta externa, e incluidos tras haber sido informados y haber firmado el consentimiento. En la primera visita se realizará una citología anal y PCR del VPH, así como la recogida de datos epidemiológicos y analíticos. Las revisiones se harán cada 3, 6 ó 12 meses en función de hallazgos, en caso de que el paciente padezca ASIL o permanencia de VPH, se indicará realización de rectoscopia con instilación de ácido acético al 5% y biopsia de lesiones.

INTRODUCCIÓN:

En las últimas décadas estamos evidenciando un incremento de las neoplasias asociadas al virus del papiloma humano (VPH) distintas al cáncer de cuello uterino, siendo una de las más emergentes y problemáticas la neoplasia del canal anal (carcinoma escamoso del canal anal). El cáncer anal es infrecuente, supone un 1.6% de las neoplasias digestivas en EEUU, aunque su incidencia ha aumentado en las últimas décadas (1). El incremento en la incidencia del cáncer anal se ha asociado a varios fenómenos como el tabaquismo, ser receptor anal en las relaciones sexuales, verrugas genitales, número de parejas sexuales distintas e infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (2). En relación con lo anterior, dentro de la población general se identifican algunos grupos con un riesgo incrementado de padecerlo como son los hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres (HSH), personas infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), mujeres con neoplasia intraepitelial de cérvix (CIN) y receptores de trasplante (9).

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH):

El virus del papiloma humano (VPH) constituye la infección de transmisión sexual más frecuente a nivel mundial, especialmente en la población joven, sexualmente activa. El VPH es un virus pequeño, cuya composición genómica es ácido desoxirribonucleico (DNA) y puede ser identificado mediante las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas genómicas sobre el DNA viral, éstas han permitido identificar distintos tipos de VPH y sus características (3).

Hasta la fecha, se han descrito numerosos serotipos de VPH, que clásicamente se han clasificado según el riesgo oncogénico de inducir cáncer de cérvix, en base a lo cual, se distinguen 3 grupos de serotipos de VPH: 1.- Serotipos de alto riesgo (16, 18). 2.- Serotipos de riesgo intermedio (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58). 3.- Serotipos de bajo riesgo (6,11, 42, 43, 44). De todos ellos el serotipo más frecuente es el 16, que se aísla en aproximadamente un 50 % de los casos (4).

En el caso de los hombres, la seroprevalencia de los tipos de VPH aislados en el canal anal, es parecida a la referida en las mujeres y el cáncer de cérvix. El serotipo 16 también fue el más frecuentemente aislado, y se observan con más frecuencia algunos serotipos distintos a los que suelen detectarse en el caso del carcinoma de cuello uterino, como son los serotipos: 53, 58, 61 y 70 (5).

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y HOMBRES QUE TIENEN SEXO CON HOMBRES VIH POSITIVOS:

En los últimos años, se ha investigado la prevalencia del VPH en el canal anal de pacientes con distinto riesgo a la hora de desarrollar un cáncer anal, encontrándose las siguientes tasas de colonización por VPH a dicho nivel: hombres heterosexuales 33%, HSH VIH negativos 60%, mujeres VIH positivas heterosexuales 76% y en HSH VIH positivos 93% (17, 18 ,21).

El grupo más estudiado en los últimos años, en cuanto a prevalencia de VPH en el canal anal, ha sido el de los pacientes VIH positivos HSH, los datos de prevalencia varían según las series, pero están entorno a un 75%, de los cuales más de la mitad de los serotipos aislados corresponden a serotipos de alto grado (6,7,8,9,32). A continuación se exponen algunas de las series más relevantes (como denominador común en todas ellas cabe señalar que la detección de VPH, se realizó mediante PCR y se obtuvieron del canal anal):

1.- Salit IE et al: Se analizaron muestras procedentes de canal anal para detección de VPH mediante PCR, en 401 HSH VIH positivos, detectándose una prevalencia de VPH del 93 %, con un 92% de aislamiento de múltiples serotipos en un mismo individuo y un 88% de ellos fueron serotipos oncogénicos (6).

2.- Wilkin TJ et al: Sobre una muestra de 92 hombres VIH positivos (de los cuales el 60% aseguraban haber sido receptores anales), el 61% presentó VPH de alto riesgo. El tipo más frecuente resultó ser el 16 (17% participantes), seguido del 52(10%), 18(8%) y 45(8%) (7).

3.- Damay et al: En este estudio, la muestra fue con 67 pacientes VIH positivos HSH, de ellos el 74.6%, presentó una infección por al menos un tipo de VPH, el 76% de estos resultaron colonizados por varios tipos distintos de VPH (2-9 serotipos). Los serotipos aislados más frecuentes fueron VPH 44/55 (19.4%); VPH 53 (19.4%), VPH 16 (16.4%); VPH 39 (16.4%) y VPH 42 (14.9%) (8).

4.- En un artículo de revisión publicado en 2006 por Chiao E, Giordano TP y Palefsky JM, se comentan los porcentajes de aislamiento de VPH del canal anal en pacientes VIH positivos (hombres y mujeres) de las distintas series publicadas en los últimos 15 años.(9):

Kreuer et al (2005): Pacientes varones de Alemania, de los que 103 eran VIH positivos. Se aisló VPH de alto grado en el 53% de los participantes.

Palefsky et al (2005): 357 hombres VIH positivos en San Francisco, California. De ellos se aisló VPH de alto grado en un 95%

CÁNCER ANAL :

De manera equivalente, la prevalencia de cáncer de canal anal en HSH VIH positivos es de 70 casos /100.000 personas, frente a 0,8 casos/100.000 en la población general. La trascendencia de una infección persistente por VPH de serotipos oncogénicos es la mayor predisposición al desarrollo de lesiones anogenitales entre las que destacan el carcinoma intraepitelial de cérvix, neoplasia intraepitelial anal, de vulva, pene y orofaríngea, y su posterior progresión a carcinoma invasivo de células escamosas (30).

El ano está formado por el canal anal, revestido por una mucosa, y el margen anal, revestido por la epidermis. El límite proximal del ano empieza a nivel de la inserción de la porción puborrectal del músculo elevador del ano y el esfínter anal externo, y se extiende distalmente hasta el margen anal a lo largo de una distancia de aproximadamente cuatro centímetros. El canal anal se divide a través de la línea dentada, que es una línea macroscópica que marca la transición entre la mucosa glandular y la mucosa escamosa, también conocida como zona de transición. La región proximal del ano, está cubierta por una mucosa, en la que a su vez se distinguen tres tipos histológicos distintos de epitelio: glandular, transicional y escamoso. Los tumores que nacen en la mucosa de cualquiera de los tipos epiteliales anteriores se denominan tumores del canal anal y se tratan de forma parecida. Los tumores que crecen en la piel o distales a la unión escamosa mucocutánea se consideran cánceres de piel perianales, y se tratan como neoplasias de la piel (10).

En una serie de 192 pacientes con tumores malignos del canal anal se observó la siguiente distribución entre los distintos tipos histológicos (11):

- Carcinoma escamoso :74%
- Adenocarcinoma : 19%
- Melanoma : 4%
- Otros (neuroendocrino, carcinoide, sarcoma de Kaposi, leiomiomasarcoma , linfoma): 3%
- Los adenocarcinomas que crecen en el canal anal se consideran tumores rectales y se tratan como tales.

El American Joint Committee on Cancer (AJCC) estableció un sistema de estadiaje TNM (T : tamaño del tumor , N : ganglios linfáticos afectados , M : metástasis) para el cáncer de canal anal, que se basa en el tamaño de la lesión/invasión de estructuras vecinas , la presencia o ausencia de nódulos linfáticos afectados y la presencia de metástasis (16).

En una serie de 270 pacientes, el estadiaje inicial en el momento del diagnóstico fue el siguiente : T1 : 9% ; T2 : 51%; T3 : 30%; T4 : 10 % ; N+ : 13% .

En esta misma serie de pacientes, la supervivencia a los 5 años según el estadio TNM fue de: T1: 86%; T2: 86%; T3: 60%; T4: 45 %; N0: 76%; N+: 54% (12).

La mucosa del canal anal (unión escamo-columnar) presenta unas características comunes a la unión escamo-columnar de la mucosa del cuello uterino, como la susceptibilidad aumentada a los efectos oncogénicos del VPH. La condición de premalignidad de la neoplasia intraepitelial cervical (CIN) asociada a la infección por el VPH también se observa a nivel del canal anal(20). En la actualidad las lesiones que induce la infección crónica por VPH a dicho nivel se clasifican empleando dos métodos diferentes que se correlacionan entre sí, como son la citología e histología. En cuanto a la citología las alteraciones halladas se denominan lesiones escamosas intraepiteliales anales (ASIL) que se subdividen en lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL), lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL), éstas últimas consideradas como condición de premalignidad (20), y lesiones indeterminada/borderline, aquellas con hallazgos citológicos sugestivos de LSIL pero que no son concluyentes per sé como por ejemplo la metaplasia escamosa, binucleaciones abundantes o hiperqueratosis (26).

En lo que respecta a la histología se emplea la clasificación de Bethesda , que en este caso denomina a las lesiones intramucosas como neoplasia intraepitelial anal (AIN) , dentro de la cual se pueden distinguir asimismo varios grados : AIN I, II y III. AIN I corresponde a una afectación de bajo grado de la mucosa , que per se no implica una condición de premalignidad , mientras que los grados II Y III corresponden a un estadio previo al carcinoma in situ y se consideran lesiones con capacidad de crecimiento neoplásico extramucoso .El grado de correlación existente entre citología e histología es el siguiente, un estadio AIN I se corresponde con una citología LSIL, y un estadio AIN II ó III con HSIL (20).

La progresión de ASIL a carcinoma de células escamosas invasivo anal (SCC) se ha relacionado con varios factores que incluyen el estar infectado por el VIH y por los serotipos de alto riesgo de VPH (20,22).

El impacto del cáncer anal en la población VIH se asemeja mucho a la epidemiología de cáncer de cérvix. Antes del uso de la técnica de Papanicolau (Pap), como test de despistaje para identificar y decidir tratamiento en el caso de neoplasia intraepitelial cervical, la incidencia de este cáncer se estimaba en 40-50 casos por 100.000 habitantes; posteriormente, gracias a la instauración del programa de detección precoz en el que se empleaba de forma rutinaria esta técnica descendió hasta 8-10 casos por 100.000 individuos. Previa a la epidemia VIH, la incidencia de cáncer anal entre la población de HSH era de 12-37 por 100.000 individuos, comparable a la de cáncer de cérvix antes de la instauración del Papanicolau; tras esta, la incidencia de cáncer anal ha aumentado hasta 70-100 casos por 100.000 habitantes (7,20,26).

Son numerosos los estudios, que han sugerido que la incidencia de cáncer anal entre la población VIH (hombres y mujeres) es considerablemente mayor que la de población seronegativa para el VIH, la velocidad de progresión de las lesiones premalignas a carcinoma in situ también está aumentada; de forma que según algunos estudios en 2 años un 32% de los HSH VIH positivos con citología anal negativa progresaron a un estadio AIN I, frente a 8% de

los seronegativos, y aquellos en los que se había detectado un estadio AIN I o tenían lesiones indeterminadas, en el transcurso de 4 años, 50% progresaron a AIN II ó III (7,20,26).

SCREENING DE LESIONES INTRAEPITELIALES ESCAMOSAS ANALES (ASIL):

Los estudios realizados hasta ahora para la detección de ASIL han empleado la citología mediante la técnica de Papanicolau, con obtención de las muestras de varios sitios localizados en la región anorrectal (porción caudal del recto, canal anal y margen anal); la técnica de Papanicolau, se ha comparado con la biopsia dirigida mediante anoscopio de alta resolución y se ha encontrado un nivel de concordancia variable según los estudios publicados. La citología anal, comparada con la histología (procedente de la biopsia de lesiones a nivel del canal anal tras tinción con ácido acético al 5%) según algunos autores ha mostrado una sensibilidad que oscila entre: 47-93%, y una especificidad entre 32-92%; siendo la sensibilidad superior en pacientes VIH positivos, con CD4 inferior a 200 células/microlitros lesiones con resultado histológico correspondiente a un alto grado (AIN II ó III), y mayor número de cuadrantes afectados tras inspección con anoscopio de alta resolución (26, 27, 33).

Adicionalmente, se ha demostrado la utilidad de la citología después del tratamiento de la neoplasia anal, como método de screening para detectar recurrencias de la enfermedad (26, 31, 35).

No sólo el estar infectado por el VIH supone un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer anal, si no que se han detectado otros factores implicados; entre ellos cabe destacar: grado de inmunodeficiencia celular expresada mediante el recuento total de linfocitos CD4 (7,20,23), la infección por serotipos con alto riesgo oncogénico del VPH (7,18,23,24), ser receptor anal (7,18,24), número de parejas sexuales distintas (7,18,24) y edad inferior a 40 años (7).

La introducción del tratamiento antirretroviral de alta eficacia (TAR), por otra parte, no ha demostrado una reducción significativa en la incidencia de AIN (25,29). Finalmente, diferentes factores de riesgo no se han asociado claramente como son tabaquismo, otras enfermedades de transmisión sexual (ETS) y ausencia de uso de métodos barrera (7,23).

VACUNACIÓN EN HSH :

A partir de Junio del 2006 la Food and Drug Administration (FDA) aprobó el uso de la vacuna tetravalente frente al VPH (engloba 2 serotipos asociados con el cáncer anogenital : 16 y 18 y otros 2 tipos implicados en la génesis de verrugas anogenitales), en mujeres con edades comprendidas entre 9 y 26 años, con el fin de prevenir enfermedades causadas por los serotipos de VPH : 6/11/16 /18: cáncer de vulva, cérvix uterino y vagina ,verrugas genitales, lesiones intraepiteliales CIN 1, CIN 2, CIN 3 , adenocarcinoma cervical in situ; y neoplasia intraepitelial vaginal o vulvar grado 2 y 3. La eficacia de la vacuna, se ha observado en multitud de ensayos internacionales, obteniéndose tasas de seroconversión de 97.5% a los 5 años de la vacunación y la prevención de lesiones intraepiteliales consideradas premalignas (CIN 2, 3 y adenocarcinoma in situ) causadas por los tipos 16 y 18, en mujeres que no estaban infectadas por ninguno de dichos serotipos en un 90% (13).

En la actualidad se están llevando a cabo varios ensayos clínicos para evaluar la eficacia de la vacuna tetravalente frente al VPH en varones, cabe destacar el que se está desarrollando en la Universidad de San Francisco; se trata de un ensayo aleatorizado , de casos/controles, a doble ciego (4065 hombres jóvenes de entre 16-26 años), que tiene como objetivo valorar la disminución de las patologías atribuibles al VPH como verrugas genitales externas, neoplasia intraepitelial peneana, perineal, perianal, y cáncer de pene y perianal en los pacientes que recibieron la vacuna. El grado de respuesta se evalúa mediante la biopsia de todas las nuevas lesiones que aparecen en las regiones anteriormente especificadas, durante un periodo de 2 años, con controles semestrales. De la biopsia se obtiene un resultado histológico, así como la PCR para VPH. Los resultados mostrados hasta el momento evidencian una disminución en las lesiones causadas por el VPH en aquellos pacientes que recibieron la vacuna (ej.- Reducción de condilomas en un 89%; reducción de la neoplasia intraepitelial de pene en un 100%, eficacia frente a la infección persistente de los serotipos que contiene la vacuna (6/11/16/18) de un 85% y ausencia de detección de DNA de VPH para estos mismos serotipos de un 44%) (14,28).

OPCIONES TERAPEÚTICAS :

Hasta la fecha existen varios trabajos publicados acerca del abordaje terapéutico de las lesiones consideradas premalignas (AIN II, AIN III o HSIL), sin que se llegue a establecer un procedimiento universal y definitivo. De estos trabajos, cabe mencionar el realizado por el grupo de San Francisco (Stanford University School of Medicine) (15); y el grupo de Nueva York (Mount Sinai School of Medicine) (16).

En el primero se estudiaron de forma prospectiva a pacientes con HSIL de gran volumen (lesiones que abarcaban la circunferencia del canal anal o prácticamente circunferenciales), que eran diagnosticadas mediante anoscopio de alta resolución y confirmado histológicamente mediante biopsia dirigida a las lesiones. Una vez llevada a cabo la exéresis de las lesiones, los pacientes eran revisados cada 3-6 meses mediante anoscopio de alta resolución más biopsia y citología. Si en cualquier momento se detectaba recurrencia (HSIL) se volvía a remitir para una nueva intervención. El periodo de seguimiento fue de 32.3 ± 20.6 meses. La muestra seleccionada estaba compuesta por 37 HSH, de los cuales 29 eran VIH positivos y 8 eran VIH-negativos. A todos ellos se les sometió a resección quirúrgica mediante anoscopio de alta resolución, previa tinción con ácido acético al 3% y Lugol. Posteriormente se analizó la técnica en base a seguridad y eficacia. En cuanto al primer "end point" se recogieron un 50% de casos de dolor local mal controlado durante una media de tres semanas, ninguno presentó abscesos, sangrado, estenosis o incontinencia de esfínter. El segundo "end point", evidenció una clara tendencia a la recurrencia en los pacientes VIH-positivos. El 79 % de los pacientes VIH-positivos (23/29) presentaron recurrencia /persistencia de HSIL en una media de seguimiento posterior a la cirugía de 12 meses, mientras que ninguno de los individuos VIH-negativos presentaron recurrencia (0/8) ($p=0.003$). De los pacientes reintervenidos, un 66% presentaron recurrencias nuevamente. Ninguno de los 37 pacientes presentaron carcinoma escamoso del ano una vez finalizado el estudio. De este estudio se pueden extraer algunas nuevas ideas acerca del tratamiento de este tipo de lesiones, como que la ablación quirúrgica parece una técnica segura y efectiva en eliminar las lesiones HSIL en los pacientes VIH-negativos, si bien el tamaño de muestra empleado fue pequeño, y serían necesarios más estudios para poder determinar la eficacia en los pacientes VIH-positivos (15).

En el segundo estudio mencionado (Nueva York), se evaluó de manera retrospectiva la eficacia del uso de un coagulador con infrarrojos (IRC), y sus resultados fueron los siguientes.

Se analizaron de forma retrospectiva a 68 pacientes VIH-positivos HSH que habían sido sometidos a una ablación mediante IRC de una lesión HSIL confirmada mediante el uso de anoscopio de alta resolución y biopsia. Una vez confirmada la lesión HSIL, se repitió la anoscopia de alta resolución y se volvieron a localizar las lesiones previamente descritas. Bajo anestesia local, se aplicaron los pulsos de luz del IRC hasta que se consideraba que la coagulación se había realizado exitosamente (palidecimiento de la lesión). De los resultados obtenidos destaca que el promedio de lesiones tratadas mediante IRC en cualquier visita fue de 1.03. El 36% de los pacientes tuvieron que someterse a una segunda coagulación mediante IRC por persistencia o lesión metacrónica, y el 15% se sometieron a una tercera IRC. Posteriormente al primer tratamiento, la persistencia o recurrencia de las lesiones HSIL fue del 65%, con una media de 203 días post-tratamiento. Los restantes 24 sujetos (35%) nunca mostraron recurrencia por un periodo de 413 días.

La diferencia entre los pacientes en los que se redescubrió recurrencia de HSIL no resultó estadísticamente significativa en cuanto a recuento de CD4 y edad. El número total de lesiones tratadas en los 68 pacientes fue de 165 en la primera visita y el 43% (23/68) demostraron persistencia de al menos una de estas áreas (16).

HIPÓTESIS

La citología anal es un método sensible en el despistaje de la neoplasia de canal anal y similar a la biopsia dirigida mediante rectoscopio y tinción con ácido acético al 5%, sobre todo en lesiones de alto grado de malignidad; además, de ser una prueba adecuada en el seguimiento de dichas lesiones. Los pacientes VIH varones que tienen sexo con otros hombres tienen mayor incidencia y prevalencia del virus papiloma humano y mayor número de anomalías en la mucosa del canal anal que los VIH negativos.

OBJETIVOS :

PRINCIPAL:

1. Validar las pruebas de despistaje precoz (citología mediante Papanicolau, y anoscopia con biopsia dirigida de las lesiones sospechosas) de ASIL en el canal anal de pacientes HSH infectados por el VIH. .

SECUNDARIOS:

1. Estudiar la prevalencia e incidencia del VPH y sus distintos serotipos mediante PCR en el canal anal de HSH infectados por el VIH de nuestra área sanitaria, y compararla con la de HSH VIH seronegativos equiparables en edad.

2. Investigar los factores de riesgo implicados en el desarrollo de ASIL en los pacientes HSH infectados por el VIH.

3. Establecer un protocolo de seguimiento de la población en riesgo y de la que padezca ASIL.

4. Valorar la indicación de la vacuna del VPH en nuestra población de HSH infectados por el VIH.

MATERIAL Y MÉTODOS :

1. POBLACIÓN DE REFERENCIA Y DE ESTUDIO:

1.2- Casos: Pacientes varones que tienen sexo con hombres (HSH) VIH positivos procedentes de la consulta de Enfermedades Infecciosas del hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada).

1.2- Controles: HSH VIH negativos procedentes del entorno de los pacientes que acceden de forma voluntaria a participar en el estudio.

2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Se incluirán a todos los pacientes VIH varones que mantengan relaciones sexuales con hombre (HSH) mayores de 18 años perteneciente a la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, que de forma voluntaria den su consentimiento para formar parte del estudio.

3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

Pacientes VIH menores de 18 años, mujeres, y hombres infectados por el VIH que no tienen relación sexual con hombres

4. DISEÑO:

Se trata de un estudio prospectivo de 3 años de duración, de Septiembre de 2008 a Septiembre de 2013, en el que de forma consecutiva se incluirán a pacientes HSH infectados por el VIH procedentes de la consulta de enfermedades infecciosas del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada; y simultáneamente a los controles HSH seronegativos equiparables en edad procedentes del entorno de los pacientes. En la primera visita, se explicarán las condiciones y objetivos del estudio, se facilitará un documento de consentimiento informado para su firma, y se recogerán todos los datos que se especifican más adelante en el marco de la ley de protección de datos vigente (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal). En esa misma visita se procederá a la toma de 2 muestras de la mucosa de de canal, una para citología y otra para estudio de VPH mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En las siguientes visitas, se aplica el siguiente **algoritmo de seguimiento** según los resultados obtenidos en la primera citología y PCR de VPH :

- a) Si la Citología y PCR resultan negativas se repiten ambas al año.
- b) Si la Citología resulta positiva (para LSIL) con PCR negativa se repiten ambas pruebas a los 6 meses.
- c) Si la Citología resulta negativa con PCR positiva se repiten ambas a los 6 meses.

d) Si Citología patológica para LSIL y PCR positivas se repiten ambas a los 6 meses.

e) Si en cualquier momento la citología muestra un estadio compatible con HSIL, el paciente se deriva a la unidad de rectoscopias para realización de una rectoscopia preferente, con toma de biopsias de las lesiones sospechosas, bien a nivel macroscópico, bien tras tinción con ácido acético al 5%. En caso de confirmación, se remite a la unidad de Colorrectal de nuestro centro, para valoración por parte de Cirugía de tratamiento local.

f) Cuando en dos tomas consecutivas, se encuentran resultados compatibles con LSIL en la citología, independientemente del resultado de la PCR para VPH, se deriva a la unidad de rectoscopia para realización de una rectoscopia con tinción con ácido acético al 5%.

g) Una vez que un paciente se somete a una exploración mediante rectoscopio Standard, si el resultado de la biopsia es compatible con normalidad o LSIL, continuará con controles citológicos semestrales y rectoscopias anuales con opción de rebiopsiar en caso de encontrar lesiones sospechosas. La clasificación histológica de las muestras de mucosa anal obtenidas mediante biopsia es la siguiente: Normal, AIN I (corresponde a LSIL), AIN II, AIN III ó carcinoma in situ (correspondencia estas últimas con HSIL) y carcinoma infiltrante.

4.1 Tamaño muestral y procedimiento de muestreo: Para la validación de las pruebas de despistaje, estimamos conseguir una sensibilidad mínima cercana al 70%, por lo que para conseguir una precisión del 5,0% en la estimación de una proporción mediante un intervalo de confianza asintótico Normal al 95% bilateral, asumiendo, será necesario incluir 323 pacientes en el estudio.

4.2 Análisis de datos:

Análisis descriptivo: se realizará una descripción de las principales variables recogidas en el estudio, se calcularán medidas de tendencia central y dispersión (media, desviación típica, mediana, moda, percentiles) para las variables cuantitativas y frecuencias absolutas y relativas para las cualitativas. Se calculará la prevalencia de VPH con su intervalo de confianza al 95%, así como la incidencia acumulada y densidad de incidencia

Análisis bivariante: se realizará un análisis bivariante para estudiar la relación entre los posibles factores de riesgo y la presencia de carcinoma anal. Para las variables cuantitativas se aplicará el test t-Student para muestras independientes o Mann-Whitney en caso de no normalidad. Para las cualitativas, el test chi-cuadrado de Pearson o Fisher si no se cumplieran los criterios de aplicación. Para comprobar si las diferentes variables cumplen la hipótesis de normalidad, se utilizará el test de Kolmogorov-Smirnov

Análisis multivariante: se realizará un análisis mediante regresión logística. Se introducirán en el modelo las variables que hayan resultado estadísticamente significativas, además de las

clínicamente relevantes. Se utilizará el método de selección de variables por pasos sucesivos, considerando en cada paso una probabilidad de entrada de 0.05, y 0.10 para salida.

Para la validación de la citología anal, se calculará el valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, sensibilidad y especificidad de la prueba, utilizando la biopsia como prueba confirmatoria.

Para todos los test se considerará un nivel de significación de 0.05. El software estadístico utilizado será el SPSS 15.0.

5. VARIABLES A RECOGER:

5.1- Primera visita:

5.1.1 Número asignado al paciente en el estudio, fecha de inclusión en el estudio, edad, nacionalidad, género, número de parejas distintas con las que mantuvo relaciones sexuales como receptor anal en los últimos 12 meses, uso de profilácticos, situación laboral (activo o jubilado), nivel de estudios, tabaquismo, enolismo (unidades de bebida estándar: UBE), adicción a drogas por vía parenteral (ADVP), forma de adquisición del VIH (homosexual /bisexual, heterosexual, adicto a drogas por vía parenteral, desconocido), meses de diagnóstico de VIH.

5.1.2. Estadio CDC previo y el correspondiente a visita, infocitos CD 4 basales, carga viral basal, linfocitos CD4 Nadir, tiempo de duración del nadir, naive, meses en tratamiento antirretroviral (TAR), línea de TAR actual, efectos adversos del TAR, abandono del TAR, motivos del abandono del TAR, TAR de rescate, tratamiento concomitante, metadona.

5.1.3. Otras infecciones: Hepatopatía crónica por virus de la hepatitis B (VHB) o virus de la hepatitis C (VHC), serología luética positiva, otras enfermedades de transmisión sexual, condilomatosis, infección tuberculosa latente, enfermedad tuberculosa tratada o activa, otras enfermedades concomitantes.

5.1.4. Hemograma, bioquímica (glucosa, perfil lipídico) CD4, carga viral del VIH previo a la toma de citología.

5.1.5 Citología y PCR de mucosa de canal anal.

5.2- Siguietas visitas (decir cada cuanto se reazlirá haz referecna al algoritmo de la tabla 1):

5.2.1. Número de parejas distintas con las que ha mantenido relaciones sexuales como receptor anal desde la visita anterior, número de CD4 , carga viral del VIH, inicio de TAR.

5.2.2. Nueva toma de citología y PCR.

5.2.3 Rectoscopia y biopsia (se solicitará a aquellos pacientes con dos resultados consecutivos en la citología: LSIL o borderline y/o aislamiento de VPH de alto grado; se solicitará a todo

paciente que en cualquier momento presente una citología compatible con HSIL o clínica sugestiva de neoplasia anal: sangrado , palpación de masa a dicho nivel , relaciones sexuales anales dolorosas ...).

6. MÉTODOS EMPLEADOS

6. 1. Tipaje de HPV mediante PCR:

El estudio de PCR del VPH se realizará de la segunda toma extraída de la mucosa de canal mediante un escobillón tipo Invasive sterile Eurotubo collection swab (CE 0318) impregnado en suero fisiológico. La muestra se enviará inmediatamente al laboratorio de Anatomía Patológica para su análisis y validación por parte de un mismo patólogo especializado.

La PCR es una técnica que permite aumentar el número de copias de genoma presentes en la muestra, facilitando la detección de microorganismos específicos (en nuestro caso, el VPH); aumentando de este modo la sensibilidad . El proceso consta de tres etapas: desnaturalización del ADN de doble cadena hasta ADN monocatenario, reconocimiento de los iniciadores o primers por las secuencias de ADN monocatenario y su unión al mismo, y extensión de los primers para completar la secuencia del ADN patrón. Al repetir este proceso de forma cíclica se puede obtener una replicación exponencial del número de copias que había en la muestra.

6.1.1 Extracción de DNA: Instrumental:Cobas Ampliprep (Roche). Reactivos:Extracción con Kit CAP- TNAI (Roche), Fungible: SPU, K- Tips, Output tubes y Systems Reagents (Roche). PCR:Instrumental: Amplificación en termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Reactivos:Amplificación con kit Linear Array HPV Genotyping Test.

6.1.2. Visualización: Instrumental:Genotipado en Profiblot T 48 (Tecam). Reactivos: Kit Linear Array HPV Genotyping Test , Kit de detección LINEAR ARRAY

6.2. Citología en capa fina: Se realiza mediante un bastón con torunda de algodón impregnado en suero fisiológico, con el que se practican tres rotaciones por las paredes del canal anal (a dos centímetros del ano) y se incluyen en un medio líquido (ThinMayer liquid-ThinPrep Pap Test). La muestra se se enviará inmediatamente al laboratorio de Anatomía Patológica para su análisis por parte siempre del mismo patólogo especializado .

Instrumental:Procesador Thin Prep 2000 (Hologic).

Reactivos : Viales Tin Prep de recogida de muestras. (Hologic), Filtros Tin Prep para muestras no ginecológicas. (Hologic).

La citología se clasifica como: normal, indeterminada/borderline (hiperqueratosis, metaplasia escamosa, binucleaciones abundantes, todas ellas sugestivas de ASIL pero no concluyentes), y ASIL (LSIL o HSIL).

6.3. Rectoscopia: Equipo de endoscopia Olympus, con procesador Exera CV-145 y endoscopio GIF-Q145. Son endoscopios estándar de 9 mm con canal de trabajo de 2,8 mm, sin ningún sistema especial de aumento de imagen. Se realiza una exploración corta, de unos 15-20 cm, realizando en todos los casos maniobra de retrovisión para mejor visualización de la línea pectínea, que en visión directa no siempre se puede valorar correctamente. La irrigación del ácido acético se realiza con un catéter de CPRE, las biopsias se realizan con fórceps EndoJaw de Olympus. Tras la instilación de ácido acético al 5% , se tomará como referencia para proceder a la biopsia , aquellas lesiones que cambien de coloración con dicha tinción.

Las muestras obtenidas se envían al departamento de Anatomía Patológica , donde un mismo patólogo analiza las citologías y las biopsias anales.

RESULTADOS:

Hasta la fecha se han analizado los resultados de 54 pacientes VIH HSH procedentes de la consulta de Infecciosas del Hospital Virgen de las Nieves (Granada) , con fecha de inicio de entrada en el estudio Noviembre 2008 hasta Mayo 2010 .

La edad media fue de: $34,67 \pm 8,79$ años , el tiempo de diagnóstico de VIH $39,61 \pm 56$ meses, la cifra nadir CD4 $478,15 \pm 244,96$ cel/mL , el 22,6% estaban en estadio SIDA (A3, B3 , C1, C2 o C3). El 57,4% no habían iniciado nunca el tratamiento antiretroviral de alta eficacia (TAR) , mientras que el 42,6% estaban recibiendo TAR , de estos últimos 6,89% habían presentado un fracaso virológico, 5,5% hepatitis crónica por el virus de la hepatitis C, y el 5,5% hepatitis crónica por el virus de la hepatitis B, 18,5% tenían la serología luética positiva ,8% infección tuberculosa latente, 57,4% eran fumadores . El promedio de parejas sexuales distintas con las que habían mantenido relaciones sexuales anales , acumuladas en 12 meses fue de $9,7 \pm 28,7$ (1-200) , 74,15% usaban métodos barrera (preservativo) siempre .

Resultados de la citología anal : En el 9,3% falló la técnica de la toma de la muestra , no obteniéndose material suficiente para su análisis , 12 (22,2%) la citología fue normal , y en 37 (68,5%) patológica , de estas 75,67%(28/37) fueron compatibles con un estadio LSIL , y 24,3% (9/37) fueron indeterminadas o borderline .

Resultados de la PCR para VPH: Se realizó en 46 pacientes, de los cuales 44(95,65%) fueron positivos para VPH ; 75%(33/44) se aislaron serotipos oncogénicos , 52,7% (23/44) resultaron positivos para tipos oncogénicos y no oncogénicos. Los serotipos más frecuentemente encontrados fueron:11(22,7%), 16 (34%), 18 (18%), 45(18,8%), 51 (20%), 61(18,18%) .

DISCUSIÓN :

Aquellos casos en los que se aislaron serotipos oncogénicos de VPH , se observó una asociación estadísticamente significativa con una citología patológica ($p=0.008$), y de ellos el serotipo 16 fue el más destacable en la significación estadística ($p=0,009$) . El serotipo 11 mostró una tendencia a la significación ($p=0,085$).

Las otras variables analizadas consideradas, como edad , estadio CDC , carga viral , otras enfermedades no mostraron asociación estadísticamente significativa con el diagnóstico de ASIL, parece que había una tendencia a la significación parámetros contemplados como la edad al diagnóstico de VIH , siendo más jóvenes aquellos con citología patológica $29,97\pm 6,13$ años ($p=0.08$) , mayores cifras de CD4 $613,28\pm 224,84$ ($p=0,06$) e historia previa de condilomas genitales.

CONCLUSIONES :

En conclusión, el Virus Papiloma Humano (VPH) es la enfermedad de transmisión sexual más comúnmente transmitida en el mundo. Una infección crónica de VPH oncogénicos (serotipos 16, 18, 35, 39, 53, 59 y otros), se relaciona con el desarrollo de lesiones malignas anogenitales (8,35). En HSH la incidencia de AIN y cáncer anal es particularmente alta, y mayor aún en los coinfectados por el VIH. Con la introducción del TAR se ha producido un aumento en la supervivencia de los pacientes VIH pero a su vez también de las enfermedades no-SIDA como las neoplasias asociadas al VPH. En la actualidad no está protocolizado, ni validado, ni se realiza de forma sistemática el despistaje y seguimiento de ASIL en el canal anal de pacientes VIH, si bien cada vez se publican más trabajos donde se pone de manifiesto la necesidad de establecer un seguimiento apropiado ante dichas lesiones intraepiteliales anales , debido a la alta incidencia de cáncer anal en la población VIH (hombres y mujeres independientemente de su orientación sexual) (18,24,34), la significativa morbilidad y mortalidad asociada a cáncer anal sin un diagnóstico y tratamiento precoz (9), y la posibilidad de ofrecer un tratamiento precoz y seguimiento en caso de ser diagnosticado (15).

BIBLIOGRAFÍA :

- 1.-Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics, 2007. CA Cancer J Clin 2007; 57:43
- 2.- Palefsky JM. Anal human papillomavirus infection and anal cáncer in HIV-positive individuals: an emerging problem. AIDS 1994; 8:283.
- 3.- Tillston P. Anal human papillomavirus and anal cancer . J Clin Pathol 1997; 50:625.
- 4.- Bosch FX, Manos MM, Munoz N et al . Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study group. J Natl Cancer Inst 1995; 87:796.
- 5.- Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML et al. Prevalence and risk factors for human papillomavirus infection of the anal canal in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative homosexual men. J Infect DIS 1998; 177:361).
- 6.- Irving E. Salit; Alice Lytwyn; Janet Raboud; Marie Sano; Sylvia Chong; Christina Diong; William Chapman; James B. Mahony; Jill Tinmouth. The Role of Cytology (Pap Tests) and Human Papillomavirus Testing in Anal Cancer Screening AIDS. 2010;24(9):1307-1313.
- 7.- Wilkin TJ , Palmer KF et al. Anal Intraepithelial Neoplasia in Heterosexual and Homosexual HIV-positive Men with access to Antiretroviral Therapy. JID 2004; 190:1685-91.
- 8.- Damay A, Fabre J, Costes V et al. Human Papillomavirus prevalence and type distribution , and HPV-associated cytological abnormalities in anal specimens from men infected with HIV who Have sex with men . Journal of medical Virology 2010; 82: 592-596.
- 9.- Chiao EY, Giordano TP, Palefsky JM. Screening HIV-infected individuals for anal cancer precursor lesions: A systematic Review. CID 2006; 43:223-33
- 10.- AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual , 6th ed, Greene FL, Page DL, Fleming ID et al , Springer-Verlag , New York , 2002 , p203.
- 11.- Klas JV, Rothenberg DA, Wong WD et al. Malignant tumors of the anal canal :the spectrum of disease , treatment and outcomes . Cancer 1999; 85 :1686.
- 12.- Frost DB, Richards PC, Montague ED et al. Epidermoid cancer of the anorectum. Cancer 1984; 53:1285. .
- 13.- Kahn JA. HPV for the prevention of Cervical Intraepithelial Neoplasia. NEJM 361: 271-278, July 16, 2009

- 14.- Giuliano A Palefsky J. Quadrivalent HPV vaccine efficacy against male genital disease and infection. Presented at the 25th International Papillomavirus conference .2009 May 8-14; Malmö, Sweden. Abstract O01-07.
- 15.- Chang GJ; Berry JM ; Jay N et al . Surgical treatment of High- grade Anal Squamous Intraepithelial Lesions. A prospective Study. Dis Colon Rectum 2006 Oct; 49(10):1648-9.
- 16.- Goldstone SE; Adam Z. Infrared Coagulator : A useful Tool for Treating Anal squamous Intraepithelial Lesions : Dis Colon Rectum 2005; 48:1042-1054.
- 17.- Sexually Transmitted diseases Treatment Guidelines , 2006. MMWR Recomm Rep 2006 (RR-11); 55: 1-95.
- 18 - Frisch M, Glimelius B, Adriaan JC et al. Sexually transmitted infection as a cause of anal cancer. N Engl J Med 1997; 337: 1350-1358.
- 19.- Nicol AF, Nuovo GJ, Dillner J. A summary of the 25th International Papillomavirus Conference 2009: Vaccines, screening, epidemiology and therapeutics. Journal of Clinical Virology 2010; 47:208-215.
- 20 .- Ching- Hong PV , Palefsky JM . Natural History and Clinical Management of Anal Human Papillomavirus Disease in Men and Women Infected with Human Immunodeficiency Virus. Clinical Infectious Disease 2002; 35: 1127-34.
- 21 .- Patel P, Hanson DL, Sullivan PS et al . Incidence of types of cancer among HIV-infected persons compared with the general population in the United States, 1992-2003. Ann Intern Med 2008; 148: 728-736.
- 22 .- Palefsky JM, Holly E et al. Virologic, immunologic, and clinical parameters in the incidence and progression of anal squamous intraepithelial lesions in HIV- positive and HIV-negative homosexual men . J Acquir Immune defic Syndrom Hum Retrovirol 1998; 17: 314-9.
- 23 .- Daling JR, Madeleine M et al. Human Papillomavirus, Smoking and Sexual Practices in the Etiology of Anal Cancer. Cancer 2004; 101:270-80.
- 24 .- Chin-Hong PV, Vittinghoff E. Age-Specific Prevalence of Anal Human Papillomavirus Infection in HIV- Negative Sexually Active Men Who Have Sex with Men : The EXPLORE Study. Journal Infectious Disease 2004; 190: 2070.
- 25 .- Palefsky JM, Holly EA. Anal intraepithelial neoplasia in the highly active antiretroviral therapy era among HIV-positive men who have sex with men. AIDS 2005; 19: 1407-14.
- 26 .- Nathan M, Singh N. Performance of anal cytology in a clinical setting when measured against histology and high-resolution anoscopy findings. AIDS 2010, 24; 373-379.

- 27.- Chin-Hong PV , MD ; J. Michael Berry , MD . Comparison of patient-and Clinician collected Anal Cytology samples to screen for Human Papillomavirus- Associated Anal Intraepithelial Neoplasia in Men Who Have Sex with Men. *Annals of Internal Medicine* 2008; 149: 300-306.
- 28.- Sjoerd H van der Burg , Joel M Palefsky .Human immunodeficiency virus and human papillomavirus - why HPV-induced lesions do not spontaneously resolve and why therapeutic vaccination can be successful. *Journal of Translational Medicine* 2009; 7:108.
- 29.- Palefsky JM. Perspectives anal cancer in HIV infection. *Topics HIV Med* 2000; 8: 14-7.
- 30.- Pineda CE, Berry JM . High-resolution anoscopy targeted surgical destruction of anal high-grade squamous intraepithelial lesions: a ten year experience. *Dis Colon Rectum* 2008; 51:829-35.
- 31.- Fox P. Anal cancer screening in men who have sex with men. *Curr Opin HIV AIDS*. 2009; 4: 64-7.
- 32.- Piketty C; Darragh TM. High prevalence of Anal Human Papillomavirus Infection and Anal Cancer Precursors among HIV-Infected Persons in the Absence of Anal Intercourse. *Ann Intern Med*. 2003; 138: 453-459.
- 33.- Berry JM, MD; Palefsky JM, MD. Performance Characteristics of Anal Cytology and Human Papillomavirus Testing in Patients with High-Resolution Anoscopy- Guided Biopsy of High- Grade Anal Intraepithelial Neoplasia. *Dis Colon Rectum* 2009; 52: 239-247.
- 34.- Goldstone SE, Chinedum SE , Davis TW. Detection of Oncogenic Human Papillomavirus and Other Predictors of Anal High-Grade Dysplasia in Men Who Have Sex with Men with Abnormal Cytology . *Dis Colon Rectum* 2009; 52:31-39.
- 35.- Kenneth SH , Cranston Rd. Anal Cytology screening in HIV-positive men who have sex with men :what's new and what's now? . *Current Opinion in Infectious Disease* 2010; 23: 21-25.